



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Shotaro YAMAGUCHI

Appln. No.: 09/727,769

Group Art Unit: NOT YET ASSIGNED

Confirmation No.: NOT YET ASSIGNED

Examiner: NOT YET ASSIGNED

Filed: December 04, 2000

For: NOVEL PROTEIN-DEAMIDATING ENZYME, MICROORGANISM PRODUCING
THE SAME, GENE ENCODING THE SAME, PRODUCTION PROCESS THEREFOR,
AND USE THEREOF

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

Mark Boland
Registration No. 32,197

SUGHRUE, MION, ZINN,
MACPEAK & SEAS, PLLC
2100 Pennsylvania Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20037-3213
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

Enclosures: JP P. Hei. 11-345044

Date: March 2, 2001

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 1 2 月 3 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 3 4 5 0 4 4 号

出 願 人

Applicant (s):

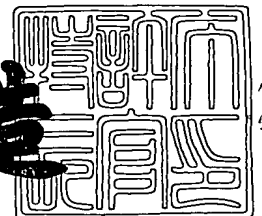
天野エンザイム株式会社



2 0 0 0 年 1 2 月 2 2 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 1 0 6 2 8 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-33804

【提出日】 平成11年12月 3日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 イギリス、 2 2 キャンスタブル ロード イートン、
ナルニッチ エヌアール4 6アールエヌ

【氏名】 山口 庄太郎

【特許出願人】

【識別番号】 000216162

【氏名又は名称】 天野製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073874

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 平

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100066429

【弁理士】

【氏名又は名称】 深沢 敏男

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100093573

【弁理士】

【氏名又は名称】 添田 全一

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100105474

【弁理士】

【氏名又は名称】 本多 弘徳

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100105647

【弁理士】

【氏名又は名称】 小栗 昌平

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100090343

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗宇 百合子

【電話番号】 03-5561-3990

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008763

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規蛋白質脱アミド酵素、それを生産する微生物、それをコードする遺伝子、その製造法及び用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する酵素。

【請求項 2】蛋白質中のアミド基に直接作用し、ペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素。

【請求項 3】該酵素が微生物由来であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の酵素。

【請求項 4】 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされているアミノ酸配列を有し、蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有するポリペプチドからなるポリペプチド。

【請求項 5】 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるポリペプチド。

【請求項 6】 蛋白質中のアミド基を脱アミドする活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド。

【請求項 7】 蛋白質中のアミド基に直接作用し、ペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず、脱アミドする活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド。

【請求項 8】 下記 (a) ~ (g) から選択されるヌクレオチドからなり、かつ、蛋白質中のアミド基を脱アミドする活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチドからなるヌクレオチド。

(a) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド、

(b) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド、

(c) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列を有するヌクレオチド、

(d) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列において、1 個又は複数個の塩基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされている塩基配列を有するヌクレオチド、

(e) 上記 (a) ～ (d) のいずれかに記載のヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、

(f) 上記 (a) ～ (d) のいずれかに記載のヌクレオチドに相同性を有するヌクレオチド、

(g) 上記 (a) ～ (f) の少なくともいずれか 1 つに記載のヌクレオチドに縮重するヌクレオチド。

【請求項 9】 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチドからなるヌクレオチド。

【請求項 10】 請求項 5 から 9 のいずれかに記載のヌクレオチドを含有することを特徴とする組換えベクター。

【請求項 11】 請求項 10 記載の組換えベクターを導入させた形質転換体。

【請求項 12】 請求項 11 記載の形質転換体を培養し、蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する酵素を生産せしめ、培養物より蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する酵素を採取することを特徴とする蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する酵素の製造法。

【請求項 13】 請求項 12 記載の形質転換体を培養し、該培養物から採取される、蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する組換えポリペプチド。

【請求項 14】 微生物を栄養培地に培養し、蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する新規な酵素を生産せしめ、該酵素を採取することを特徴とする新規な酵素の製造法。

【請求項 15】 微生物を栄養培地に培養し、蛋白質中のアミド基に直接作用し、ペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する新規な酵素を生産せしめ、該酵素を採取することを特徴とする蛋白質中のアミド基を脱アミドする作用を有する新規な酵素の製造法。

【請求項 16】 微生物がシトファガレス (Cytophagales) 或いはアクチノマ

イセテス (Actinomycetes) に分類される細菌である請求項14或いは請求項15記載の製造法。

【請求項 1 7】微生物がフラボバクテリアチェ (Flavobacteriaceae) に分類される細菌である請求項14或いは請求項15記載の製造法。

【請求項 1 8】微生物がクリセオバクテリウム (Chryseobacterium) 属、フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、エンペドバクター (Empedobacter) 属、スフィンゴバクテリウム (Sphingobacterium) 属、アウレオバクテリウム (Aureobacterium) 属及びミロイデス (Myroides) 属より選ばれる請求項14或いは請求項15記載の製造法。

【請求項 1 9】微生物がクリセオバクテリウム (Chryseobacterium) 属に属する新菌クリセオバクテリウム・エスピー (Chryseobacterium sp.) No. 9670 (FERM P-17664) である請求項14或いは請求項15記載の製造法。

【請求項 2 0】蛋白質或いはペプチドに、蛋白質或いはペプチド中のアミド基に直接作用し、ペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させることを特徴とする蛋白質或いはペプチドの修飾法。

【請求項 2 1】蛋白質或いはペプチド中のアミド基に直接作用し、ペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず、脱アミドする作用を有する酵素を有効成分としてなる蛋白質或いはペプチドの修飾用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な酵素、即ち蛋白質中の側鎖アミド基に作用して、側鎖カルボキシル基とアンモニアを遊離する作用を有する新規な酵素、その製造法及びそれを生産する新規なバクテリアに関する。更に詳細には、クリセオバクテリウム (Chryseobacterium) 属に属する新菌株クリセオバクテリウム・エスピー No.9670 (Chryseobacterium sp. No.9670) を培養し、該酵素を生産せしめ、培養物より該酵素を採取することを特徴とする蛋白質中のアミド基を脱アミドする性質を有する酵素の製造法に関する。さらに本発明は、蛋白質中のアミド基に直接作用する新規な酵素を用いた蛋白質の修飾方法に関する。さらに、本発明は、蛋白質中

のアミド基を脱アミドする性質を有する酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを導入した形質転換体、及び形質転換体を培地に培養し、該酵素を生産せしめ、培養物より該酵素を採取することを特徴とする蛋白質のアミド基を脱アミドする性質を有する酵素の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

グルタミナーゼ／アスパラギナーゼはグルタミン／アスパラギンを水解してグルタミン酸／アスパラギン酸とアンモニアにする酵素であり、これが動植物及び微生物から得られることはよく知られている。しかし、この酵素はグルタミン／アスパラギンに特異的に作用する酵素であり、ペプチド中のグルタミン／アスパラギンを脱アミドすることはできない。ましてペプチドより分子量の大きな蛋白質中のグルタミン／アスパラギンの γ/β -アミド基を脱アミドすることはできない。まして蛋白質中の状態に結合するグルタミン／アスパラギンに作用することはできない。

【0003】

また、ペプチド状態に存在するアミド基に作用する酵素としては、トランスグルタミナーゼがある。この酵素はペプチド結合グルタミンのアミド基をアシル供与体、一級アミンのアミノ基をアシル受容体として、蛋白質にアミン化合物の共有結合的導入や、蛋白質中のグルタミンとリジン両残基間での ϵ -(γ -グルタミル)リジン-ペプチド結合による架橋形成を触媒する。反応系にアミンやリジンが存在しない或いはブロックされている場合には水がアシル受容体になり、ペプチド中のグルタミン残基が脱アミドされグルタミン酸となることが知られているが、この酵素は上述のように本来アシル転移酵素であるため、通常の蛋白質に作用させると架橋反応が起こり、蛋白質を脱アミド化する反応は生ぜず、本発明の酵素とは異なる。

【0004】

また、ペプチド中に結合するグルタミンに作用して脱アミドする酵素についてはバチルス サーキュランス (*Bacillus circulans*) 由来の酵素、Peptideglutaminase I 及びPeptideglutaminase IIが知られている。前者は、ペプチドのC

末端に位置するグルタミン残基に作用し、後者はペプチド中のグルタミン残基に作用することが知られている。しかしながら、これらの酵素は高分子蛋白質には作用せず、低分子ペプチドにのみ作用する酵素である [M. Kikuchi, H. Hayashida, E. Nakano, and K. Sakaguchi, *Biochemistry*, 10巻, 1222-1229(1971)]。

【0005】

これらの酵素 (Peptidoglutaminase I 及びII) を、低分子ペプチドでなく高分子の蛋白質に作用させる試みが、複数の研究によってなされてきたが、それらの酵素が高分子蛋白質に実質的に作用せず、蛋白質加水分解ペプチドにしか作用しないことが明らかにされている。具体的には、Gillらは、乳カゼインとホエイ蛋白質に対して、nativeな状態ばかりでなく、変性後においても、Peptidoglutaminase I 及びIIいずれも作用しないことを報告している。彼らは、またそれらの蛋白質の加水分解物に対する作用性を検討した結果、Peptidoglutaminase IIのみ作用したが、分子量5000以下のペプチドにしか作用しないことを報告している (B. P. Gill, A. J. O'Shaughnessey, P. Henderson and D. R. Headon, *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 9巻, 33-41(1985))。大豆蛋白質を用いて同様の検討が、Hamadaらによって行われたが、Gillらの結果との一致を見ている。即ち、大豆ペプチド (Peptone) に対する脱アミド率が24.4-47.7%に対し、大豆蛋白質に対しては実質的に作用しないこと (0.4-0.8%) が報告されている (J. S. Hamada, F. F. Shih, A. W. Frank and W. E. Marshall, *J. Food Science*, 53巻, 2号, 671-672(1988))。

【0006】

植物の種子中に蛋白質を脱アミドする酵素の存在の可能性が報告されている (I. A. Vaintraub, L. V. Kotova, R. Shara, *FEBS Letters*, 302巻, 169-171 (1992))。しかしながら、この報告においては、部分精製品を用いて蛋白質からアンモニアの遊離を観察しているが、以下に述べる理由により、本発明に開示される酵素の存在を証明するものではないことは明らかである。即ち、部分精製品を用いている点、プロテアーゼ活性が存在しないことが確認されていない点、反応後の基質蛋白質の分子量変化が生じていないことが確認されていない点により、一つの酵素の作用ではなく複数の酵素、例えばプロテアーゼ、ペプチダーゼによ

り蛋白質から遊離したアミノ酸グルタミン/アスパラギンがグルタミナーゼ/アスパラギナーゼにより脱アミドされアンモニアが遊離されている可能性、或いは同様に生じたグルタミン含有低分子ペプチドがペプチドグルタミナーゼ様酵素により脱アミドされている可能性が残されている。或いはまたプロテアーゼの副反応により脱アミドされている可能性も否定できない。とりわけ、上記の報告中において、用いられた部分精製標品中に遊離のグルタミンに作用してアンモニアを遊離するグルタミナーゼ活性が存在することが明記されていることは特記すべきである。

このように、高分子蛋白質に作用して脱アミド反応を触媒する酵素について、単一蛋白質まで精製し、さらに遺伝子を単離し発現させることにより、その存在を証明した報告はこれまでにはなかった。

【0007】

一般に蛋白質中のグルタミン及びアスパラギン残基を脱アミド化し、カルボキシル基を生じさせると、その蛋白質の負電荷が増加し、その結果等電点が低下、水和力が増加する。さらに静電反撥力の上昇による蛋白質間の相互作用の低下すなわち会合性の低下がもたらさる。これらの変化により蛋白質の可溶性、水分散性は大きく増大する。また蛋白質の負電荷の増加は、その蛋白質の折りたみをほぐし、高次構造を変化させ、分子内部に埋もれていた疎水性領域を分子表面に露出させる。したがって脱アミド化蛋白質は、両親媒性を有し理想的な界面活性剤となり、蛋白質の乳化力、乳化安定性、起泡性、泡沫安定性が大きく向上する。

【0008】

このように、蛋白質の脱アミド化は、蛋白質の様々な機能特性の向上をもたらし、その蛋白質の用途は飛躍的に増大させる（例えばMolecular Approaches to Improving Food Quality and Safety, D. Chatnagar and T. E. Cleveland, eds., Van Nostrand Reinhold, New York, 1992, p. 37）。

【0009】

この為、蛋白質を脱アミド化する方法は、古くより盛んに研究され多くの方法が考えられてきた。蛋白質を化学的に脱アミド化させる方法としては、高温条件下での温和な酸（または温和なアルカリ処理法など）があった。一般に蛋白質中の

グルタミン及びアスパラギン残基のアミド基は、酸或いは塩基により加水分解される。しかしながらこの反応は非特異的であり、強酸、強アルカリ条件下では、ペプチド結合の切断も伴う。また蛋白質の変性も伴い、その蛋白質の機能性を損なう結果となる。

【0010】

そこでこれらの望ましくない反応を制限するため種々工夫されて、温和な酸処理（例えばJ.W. Finley, J. Food Sci. 40, 1283, 1975; C.W. Wu, S. Nakai, and W.D. Powie, J. Agric. Food Chem., 24, 504, 1976など）や温和なアルカリ処理（例えばA. Dilollo, I. Alli, C. Biloarders, N. Barthakur, J. Agric. Food Chem., 41, 24, 1993など）が考案された。また、酸としてドデシル硫酸ナトリウム(F.F. Shih and A. Kalmar, J. Agric. Food Chem., 35, 672, 1987)や陽イオン交換樹脂(F.F. Shih, J. food Sci., 52, 1529, 1987)などを触媒として用いたり、或いはまた低水分下での高温処理法(J. Zhang, T.C. Lee, and C.-T. Ho, J. Agric. Food Chem., 41, 1840, 1993)なども試みられてきた。

【0011】

しかしながら、いずれの方法でもペプチド結合の切断を完全に制限することは困難であった。ペプチド結合の切断は、脱アミド化により期待される蛋白質の機能性の向上を阻害するばかりでなく、苦味の生成ももたらし好ましくない。また酸処理法に比べて効率のよいアルカリ処理法では、アミノ酸のラセミ化や毒性の疑いのあるリジノアラニンが生ずる欠点もあった。

【0012】

一方、上述の化学法の問題点を克服するため、蛋白質の酵素的脱アミド化法もいくつか試みられてきた。高pH (pH10)条件下でのプロテアーゼ処理法(A. Kato, A. Tanaka, N. Matsudomi, and K. Kobayashi, J. Agric. Food Chem., 35, 224, 1987)、トランスグルタミナーゼ法(M. Motoki, K. Seguro, A. Nio, and K. Takinami, Agric. Biol. Chem., 50, 3025, 1986)、ペプチドグルタミナーゼ法(J.S. Hamada, and W.E. Marshall, J. Food Sci., 54, 598, 1989)の三つの方法が考えられてきたが、いずれも欠点があった。

【0013】

まずプロテアーゼ法では、その本来の反応であるペプチド結合の切断はされなかった。ペプチド結合の切断が好ましくないことは上述の通りである。

【0014】

またトランスグルタミナーゼ法では、その本来の反応であるグルタミンとリジン間でのイソペプチド結合の形成による架橋反応を押さえるためには、予めリジン残基のε-アミノ基を化学的に保護しておく必要があった。脱アミド化蛋白質を食品用などに供する場合は、可逆的保護基であるシトラコニル基などで保護しておいた後グルタミンを脱アミドさせ、その後保護基をはずし、さらに遊離したシトラコニル酸と脱アミド化蛋白質を分離しなければならなかった。これらの過程は製造コストを大きく増大させ、実用化にほど遠いものであるのは明らかである。

【0015】

一方ペプチドグルタミナーゼ法では、本酵素が蛋白質にはほとんど作用せず低分子ペプチドにのみ作用する酵素であるため、生の蛋白質には作用させることが出来ず、蛋白質加水分解物を用いる必要があった。

【0016】

このように本来酵素法においては、酵素の持つ高い基質特異性に由来する反応選択性が、化学的、物理的方法を凌ぐ最大の利点の一つであるが、蛋白質を脱アミド化する目的においては、副反応が伴わず、また高分子蛋白質に作用して脱アミド化する、ふさわしい酵素が存在しなかったため、実用化されていなかったのが現状である

【0017】

この様に、蛋白質の脱アミド化は大きな機能性向上をもたらす優れた修飾法であるにもかかわらず、化学法、酵素法いずれの方法でも欠点があり、実用化は進んでいなかった。

【0018】

【課題を解決するための手段】

よって、本発明者らは蛋白質に結合した状態にあるアミド基に直接作用して脱アミドする酵素の給源を安価な微生物に求め、鋭意スクリーニングを重ねた結果

、本発明者らが土壤中より新たに分離したクリセオバクテリウム (Chryceobacterium) 属に属する新菌株が、蛋白質中に結合するアミド基に直接作用し、ペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず、脱アミドする作用を有する酵素を生産することを見だし、本発明を完成した。本明細書においては上述の作用を有する酵素を蛋白質脱アミド酵素と称する。

【0019】

さらに、本発明者らは、蛋白質脱アミド酵素を単離、精製し、該蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、さらに、該遺伝子を含有するベクターを導入した形質転換体を用いて蛋白質脱アミド酵素を製造することが可能であることを確認した。

すなわち、本発明は、蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物を用いて蛋白質脱アミド酵素を生産する方法、さらに蛋白質脱アミド酵素を用いた蛋白質の修飾方法が提供される。

【0020】

さらに、本発明は、蛋白質脱アミド酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターを導入した形質転換体、および、該形質転換体を培地に培養し、蛋白質脱アミド酵素を生産せしめ、培養物より蛋白質脱アミド酵素を採取することを特徴とする蛋白質脱アミド酵素の製造法に関する。

【0021】

本発明の蛋白質脱アミド酵素は、蛋白質中の少なくともアスパラギン残基及びグルタミン残基のアミド基に有効であるが、特にその作用部位は、それらに限定されるものではなく、他のアミノ酸残基に結合したアミド基に対しても有効であってもよい。尚、本願明細書において蛋白質とは、蛋白質単体に限定されるものではなく、糖、脂質等との複合蛋白質等であってもよい。そして、その蛋白質の分子量は、特に限定されないが、通常、5000 (50残基) 以上、好ましくは10,000~2,000,000の範囲である。

【0022】

また、本発明の蛋白質脱アミド酵素は、蛋白質以外にもアミド基を有するペプ

チドやそれらの誘導体等に対しても脱アミド化に用いることができる。ペプチドとしては、通常、アミノ酸残基数が2～50のものが挙げられ、用途としては、栄養改善剤等に用いられているものに好適である。

即ち、本発明の蛋白質脱アミド酵素は、ポリペプチドを含むジペプチド以上から高分子の蛋白質まで基質とすることができる。なお、本願明細書の「ポリペプチド」という用語は、蛋白質を含む。

【0023】

【発明の実施の形態】

本発明の蛋白質脱アミド酵素を生産する微生物は、例えば以下のようにしてスクリーニングすることができる。即ち、土壌の懸濁液を、Z-Gln-Glyを唯一の窒素源として含有する分離用液体培地に接種することにより集積培養を行い、その培養液を同様の分離用平板寒天培地に塗布して、生育したコロニーを選択して拾う。これらの菌株を適当な液体培地で培養して、Z-Gln-Glyからアンモニア遊離活性を有する菌株を選択することができる。

【0024】

このようにして選択された菌株について更にカゼインを基質としてアンモニア遊離活性を指標として蛋白質脱アミド酵素産生微生物をスクリーニングすることができる。

【0025】

このようにしてスクリーニングされた菌株は、バージー著のマニュアル・オブ・デターミネティブ・バクテリオロジーに従ってクリセオバクテリウム属と同定され寄託番号No.9670、受託番号FERM P-17664として寄託されている。

No.9670は、グラム陰性、桿菌、非運動性、好気性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、不溶性の黄～橙色色素生成であることなどから、*Chryseobacterium* sp.である。

【0026】

文献：

①Vandamme, P., J.-F. Bernardet, P. Segers, K. Kersters, and B. Holmes.

1994. New

Perspective in the Classification of the Flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 827-831.

② Holmes, B., R. J. Owen, and T. A. McMeekin. 1984. Genus *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer, and Huntton 1923, 97^{AL}, p.353-361. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

【0 0 2 7】

I. 形態

菌体細胞の形：桿菌

グラム染色性：陰性

運動性：陰性

孢子形成：陰性

II. 生理的性質

【0 0 2 8】

【表 1】

表1

試 験 項 目	性 質
硝酸塩の還元性	陰性
脱窒反応	陰性
インドールの生成	陽性
硫化水素の生成	弱陽性 (酢酸鉛試験紙法)
デンプンの分解	陽性
クエン酸の利用: シモンズクエン酸培地	陰性
クリステンセンクエン酸培地	陽性
色素の生成	不溶性の黄～橙色色素を生成する
ウレアーゼ	陰性
オキシダーゼ	陽性
カタラーゼ	陽性
37℃での生育	陽性
42℃での生育	陰性
酸素に対する態度	好氣的に生育するが、嫌氣的には生育しない
O-F テスト	酸化的にグルコースから酸を生成する
カゼインの分解	陽性
ゼラチンの分解	陽性
DNA の分解	陽性
エスクリンの分解	陽性
マッコンキー培地における生育	陰性
VP 反応	陰性
糖類から酸の生成: L-アラビノース	陽性 (ガス非生成)
D-キシロース	弱陽性 (ガス非生成)
D-グルコース	陽性 (ガス非生成)
マルトース	陽性 (ガス非生成)
シュクロース	陽性 (ガス非生成)
ラクトース	陰性
トレハロース	陽性 (ガス非生成)
D-マンニトール	陽性 (ガス非生成)
イノシトール	陰性
グリセリン	弱陽性 (ガス非生成)
溶性デンプン	陽性 (ガス非生成)

【0 0 2 9】

尚、この酵素は、蛋白質のグルタミン残基とリジン残基の間でのイソペプチド形成を触媒する活性すなわちトランスグルタミナーゼ活性を有しておらず、既知のトランスグルタミナーゼとは区別される。また蛋白質のペプチド結合を加水分解する活性すなわちプロテアーゼ活性も有しておらず既知のプロテアーゼとも区別される。

【0030】

上述した菌株を用いて蛋白質脱アミド酵素を製造するための菌株の培養法としては液体培養、固体培養の何れでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養としては例えば、以下のようにして行うことができる。

【0031】

使用できる培地としては、蛋白質脱アミド酵素を生産する微生物が生育可能な培地であれば、如何なるものでも良い。例えば、グルコース、シュクロース、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、或いは、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものを用いることができる。

【0032】

培地のpHは例えば約3～9、好ましくは約7.0～8.0程度に調製し、培養温度は通常約10～50℃、好ましくは約20～37℃程度で、1～20日間、好ましくは3～12日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターによる好氣的深部培養法が利用できる。

【0033】

得られた培養液から蛋白質脱アミド酵素を通常的手段で単離し、本発明の蛋白質脱アミド酵素を得ることができる。例えば培養液から、蛋白質脱アミド酵素を単離精製するには、遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを組み合わせ、常法により処理して、精製した蛋白質脱アミド酵素を得ることができる。

【0034】

更に、より具体的に本発明を詳述する。即ち、蛋白質脱アミド酵素を生産する菌株として、上述したクリセオバクテリウム・エスピー No.9670 (*Chryceobacterium* sp. No.9670) を使用し、液体培地で培養し、当該酵素の産生と該酵素の精製、酵素の諸性質について検討した。

【0035】

新鮮なスラントから1白金耳の菌をとり、LB Base培地(Gibco社製)で25℃、2～7日間振盪培養し、その後遠心上清を得る。

酵素の精製方法は、培養終了後、培養液を遠心分離(12000rpm、4℃、20分間)し、上清を粗酵素液として得、UF濃縮(SEP-0013)、塩析、フェニールセファロース、セファクリルS-100により処理し酵素を精製した。精製の工程を表2に示す。

【0036】

【表2】

表2

	総蛋白質 mg	総活性 U	比活性 U/mg	回収率 %	精製度
培養上清	3547.8	606.8	0.171	100	1.00
UF濃縮液	492.8	483.6	0.981	79.7	5.74
塩析	404.3	383.5	0.949	63.2	5.55
フェニルセファロース	35.83	255.5	7.13	42.1	41.7
セファクリルS-100	7.02	236.4	33.7	39.0	197.1

【0037】

尚、酵素活性の測定は以下のように従い、基質としてZ-Gln-Gly及びカゼインを使用した。

【0038】

活性測定方法：10mM Z-Gln-Glyを含む176mMリン酸緩衝液(pH6.5) 100 μ lに酵素溶液10 μ lを添加して、37℃、60分間インキュベートした後、12%トリクロロ酢酸溶液100 μ lを加えて反応を停止する。遠心分離(15000rpm、4℃、5分間)した後、上清について以下のようにF-kit ammonia(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて測定する(A1)。別に酵素溶液の代わりに水を用いて同様にして測定する(A2)。

【0039】

F-kit ammonia 100 μ l 試薬2に上清10 μ lと水190 μ lを加え室温で5分間放置後100 μ lを用いての340nmの吸光度(E1)を測定する。残りの200 μ lに、1.0 μ lの試薬3(グルタメートデヒドロゲナーゼ)を加えた後、更に20分間室温に放置した後に残りの200 μ lの340nmの吸光度(E2)を測定する。

上記条件下で 1 分間あたり $1 \mu\text{mol}$ のアンモニアを遊離する酵素量を 1 単位とし、以下の式に従って求める。

$$u/ml = 1.76 \times [A_1(E_1 - E_2) - A_2(E_1 - E_2)]$$

基質として 10mM Z-Gln-Gly に代えて 1 % カゼイン（ハマーステン、メルク社製）を用いて同様に活性を求め、蛋白質に結合するアミド基に作用することを確認する。この時同時に反応停止後の遠心上清について 280 nm の吸光度を測定することによりプロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ活性は、この条件下で 1 OD ユニット上昇させる酵素量を 1 単位とした。

【0040】

また、トランスグルタミナーゼ活性は、基質として Z-Gln-Gly を用いた以下に示すヒドロキシサム酸法で測定した。

試薬 A 0.2M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH} 6.0$)

0.1M ヒドロキシルアミン

0.01M 還元型グルタチオン

0.03M ベンジルオキシカルボニル

-L-グルタミニルグリシン

試薬 B 3 N 塩酸

12% トリクロロ酢酸

$5\% \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1N HCl に溶解)

上記溶液の $1:1:1$ の混合液を試薬 B とする。

酵素液の 0.05ml に試薬 A 0.5ml を加えて混合し、 37°C で 10 分間反応後、試薬 B 0.5ml を加えて反応停止と Fe 錯体の形成を行った後、 525nm の吸光度を測定する。対照として予め熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵素液のかわりに L-グルタミン酸 γ -モノヒドロキシサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差により生成されたヒドロキシサム酸の量を求め、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のヒドロキシサム酸を生成する酵素活性を 1 単位とした。

尚、蛋白質の定量は BCA プロテイン・アッセイ・キット（ピアース社製）により、牛血清アルブミンを標準蛋白質として用いて定量した。

【 0 0 4 1 】

①分子量の測定：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で20kDa（図1）であった。

②至適pHの測定：各pHの（10mMのZ-Gln-Glyを含む）100 μ l [40mMブリットナーロビンソン緩衝液（pH3～12）を37℃で5分間予熱後、0.32 μ gの蛋白質脱アミド酵素を含む酵素液10 μ lを加え、37℃で60分間反応し、酵素活性を測定した。その結果、至適pHは6付近であった。

【 0 0 4 2 】

③至適温度の測定：基質溶液（10mMのZ-Gln-Glyを含む）100 μ l [176mMリン酸緩衝液（pH6.5）] に1.21 μ gの蛋白質脱アミド酵素を含む酵素溶液10 μ lを添加して、各温度で60分間反応し、酵素活性を測定した。その結果、至適温度は60℃付近であった。

【 0 0 4 3 】

④pH安定性の測定：0.75 μ gの蛋白質脱アミド酵素を含む酵素溶液22 μ l [40mMブリットナーロビンソン緩衝液（pH3～12）] を30℃で18時間処理する。その後残存する酵素活性を測定した。その結果、pH5から9付近まで安定であった。

【 0 0 4 4 】

⑤温度安定性の測定：1.76 μ gの蛋白質脱アミド酵素を含む酵素溶液43 μ l [50mMリン酸緩衝液（pH7.0）] を10分間、各温度で放置した後、残存する酵素活性を測定した。その結果、50℃まで安定であった。

【 0 0 4 5 】

⑥基質特異性：基質として終濃度1%の各種蛋白質溶液（50mMリン酸緩衝液（pH6.5））を用い、蛋白質脱アミド酵素を添加し混合後、37℃で1時間反応させた。反応後トリクロロ酢酸溶液を終濃度6.4%になるように加え反応を停止し13000rpmで3分間遠心分離を行い得られた上清中のアンモニア量を測定した。対照として、反応停止後に酵素を加え同様に処理し、上清中のアンモニア量を測定した。酵素反応試験の遊離アンモニア量から対照試験の遊離アンモニア量を差し引いて、酵素の反応によって遊離したアンモニア量を求め、アンモニア遊離速度を求めた。アンモニア遊離速度は、酵素1mgが1分間に遊離するアンモニア量として表

した。結果を表3に示す。また、反応終了後の混合液の一部をSDS-PAGEに供し、対照と比較したところ、蛋白質の高分子化及び蛋白質の低分子化は観察されなかった。このことは本酵素が既知のトランスグルタミナーゼやプロテアーゼとは区別される新規な酵素であることを意味する。

【0046】

【表3】

蛋白質	アンモニア遊離速度 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$	蛋白質	アンモニア遊離速度 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$
α -カゼイン	19.116	大豆蛋白質アイソレート	1.170
β -カゼイン	18.109	グリアジン	5.473
α -ラクトアルブミン	0.836	ミオグロビン	0.014
β -ラクトグロブリン	0.728	コラーゲン	0.117
牛血清アルブミン	0.009	ゼラチン	0.696
オボアルブミン	0.006		

【0047】

⑦等電点の測定：アンフォラインを用いた等電点集積（600V、4℃、48時間通電

）により測定したところ、本酵素の等電点は、10.0であった。

【0048】

次いで、本発明である上記した蛋白質脱アミド酵素を用いた蛋白質の修飾方法について詳述する。

各種蛋白質に本発明の蛋白質脱アミド酵素を作用させる。蛋白質としては上記酵素の作用を受けるものであればいかなるものであってもよく、例えば、植物性蛋白質であれば豆類、穀類由来の蛋白質、動物性蛋白質であればカゼイン、 β -ラクトグロブリンなどの乳蛋白、オボアルブミンなどの卵蛋白、ミオシン、アクチンなどの肉蛋白、血清アルブミンなどの血液蛋白、ゼラチン、コラーゲンなどの腱蛋白質があげられる。また、酸、アルカリなどによる化学的、あるいはプロテアーゼなどによる酵素的部分分解蛋白質や、各種試薬による化学修飾蛋白質や、合成ペプチドであってもよい。

【0049】

これら基質蛋白質は、溶液またはスラリーあるいはペースト状態で反応に供されるが、その濃度は特に限定されるものではなく、目的の脱アミド化蛋白質の望まれる性状、状態によって適宜選択される。またこの基質蛋白質の溶液またはスラリーあるいはペーストは、水溶液に限らず油脂とのエマルジョンであってもよく、さらに必要に応じて塩類、糖類、蛋白質、香料、保湿剤、着色料などが添加されたものであってもよい。

【0050】

反応条件として、酵素量、反応の時間、温度、反応溶液のpHなども特に限定されるものではないが通常、蛋白質1gに対し0.1~100ユニット、好ましくは1~10ユニット、反応温度は5~80℃、好ましくは20~60℃、反応溶液のpHは2~10、好ましくは4~8で10秒~48時間、好ましくは10分~24時間反応させる。また、これらの条件は、使用する酵素の純度や基質蛋白質の種類、純度などに応じて適宜変更して行うことができる。

【0051】

このように本発明の蛋白質脱アミド酵素を各種蛋白質に作用させることにより、蛋白質中のアミド基を直接脱アミドすることができる。その結果、生じた脱ア

ミド化蛋白質は、負電荷の増加に伴い、pIの低下、水和力の上昇、静電反発力の上昇がもたらされる。更に蛋白質の高次構造の変化により、表面疎水性の上昇がもたらされる。これらの効果により、可溶性・分散性の向上、起泡性・泡沫安定性の向上、乳化性・乳化安定性の向上など、蛋白質の機能性の改善がもたらされる。

【0052】

このように機能性が改善された蛋白質は、主として食品分野での用途が大きく拡大する。多くの植物性蛋白質は、特に通常の食品のpH範囲である弱酸性において、可溶性、分散性、乳化性などの機能性が乏しいため、多くの食品例えばコーヒー・ホワイター、ジュースなどの酸性飲料、ドレッシング、マヨネーズ、クリームなどへの使用が制限されていた。しかしながら、例えば小麦グルテンなどの植物性難溶解性蛋白質を本発明により脱アミド化することにより、可溶性、分散性が増大し、これまで使用に適さなかったこれらの食品への使用が可能となり、また分散性の高い天ぷら粉としても使用できる。

【0053】

また、製パン・製菓におけるドウの改質のためにも本酵素が使用できる。例えばグルテン含量が高いドウは伸展性が低く、ドウのハンドリング性や機械特性に問題があり、また出来上がったパンの体積や品質にも問題があった。グルテンを本酵素により脱アミド化することにより、伸展性が向上し、これらの問題を改善することが出来る。また脱アミド化グルテンが乳化剤としての効果も示し、日持ち性、ソフトネスなどの製パン特性も向上する。さらに脱アミド化グルテンを含むドウは、可塑性が低く伸展性に優れているため、クラッカー、ビスケット、クッキー、ピザや或いはパイのクラストの製造にふさわしく、これらの製造にも本酵素が使用できる。この用途のためには、小麦粉、水等からなるドウの全量に対して、本発明の酵素を通常、0.01~10000ユニット、好ましくは0.1から150ユニット、通常の方法によって混合する。

【0054】

またさらに、食品中の蛋白質に起因するアレルギー、不耐症或いは遺伝的疾患などの原因となる蛋白質を本酵素による処理によって、その毒性、アレルゲン性

を除去、低減化することが出来る。食物アレルギーの場合、一般にアレルゲンペプチドは疎水性が高いものが多い。本酵素処理により親水性ペプチドに変換されることによりアレルゲン性の除去、低下がなされる。とりわけ、小麦グルテン由来のアレルゲンに見られるように、アレルゲンペプチド中にグルタミン残基を含有する場合は大きな効果がもたらされる。

【0055】

またさらに、蛋白質を本酵素により脱アミド化することにより、蛋白質のミネラル感受性を低下させ、蛋白質・ミネラル溶液中の可溶性ミネラル含量を高め、ミネラルの人体への吸収性を高めることが出来る。一般に食品中のカルシウムの人体への吸収性は、カルシウムを有機酸やカゼインホスホペプチドを用いて可溶化させると向上することはよく知られている。同じメカニズムにより、本酵素により蛋白質を脱アミド化させることにより、多量のカルルシムを可溶化させることが可能である。この脱アミド化蛋白質を用いて、高ミネラル（例えばカルシウム）含有飲料や、ミネラル（例えばカルシウム）の吸収促進剤を製造することもできる。

【0056】

さらに、アミノ酸系調味料（動物性蛋白質の加水分解物（HAP）、植物性蛋白質の加水分解物（HVP））或いは味噌・醤油製造においては、苦味の低下、プロテアーゼの蛋白質分解率の向上、グルタミン酸含量の増強などの効果がもたらされる。一般に苦味の原因は疎水性ペプチドに由来することは周知のとおりであり、脱アミドにより苦味ペプチドの低減化がもたらされる。N末端にグルタミン酸を有するペプチドは苦味のマスキング効果を有することも知られている。また脱アミド化により、原料蛋白質の一次構造、高次構造が変化するため、その蛋白質のプロテアーゼ感受性を高めることもできる。結果、酵素的HAP,HVP製造において問題の一つであった低分解率を改善することも出来る。また一方、HAP,HVP製造においては、ピログルタミン酸生成によるグルタミン酸含量の低下が問題であった。このピログルタミン酸は遊離のグルタミンの分子内環状化により生成するものであるが、原料蛋白質を脱アミド化しておくことによりこれを防ぐことが出来、結果としてグルタミン酸含量の増強がもたらされる。

【0057】

またさらにトランスグルタミナーゼの反応制御剤としても使用できる。トランスグルタミナーゼは、蛋白質の改質剤すなわち架橋用酵素として食品分野をはじめ産業用に広く利用されている。トランスグルタミナーゼの蛋白質架橋反応により蛋白質のゲル化物を得ることや蛋白質の機能性を向上させることを目的とするのであるが、それぞれの用途、目的に応じた架橋度や機能性を有する産物を得ること、すなわち反応を適当な時点で停止させるなど架橋反応を制御することは困難であった。特に食品用蛋白質の改質の場合、EDTAや塩化アンモニウムあるいはSH試薬など一般に知られているトランスグルタミナーゼ阻害剤を添加することは好ましくなかった。

【0058】

本発明による蛋白質脱アミド酵素をトランスグルタミナーゼの反応中適当な時点で添加する事により、トランスグルタミナーゼ反応を停止させることが可能である。つまり基質蛋白質中のトランスグルタミナーゼ反応のターゲットであるグルタミン残基を、蛋白質脱アミド酵素によりグルタミン酸残基に変換することにより、トランスグルタミナーゼ反応を停止させることが出来る。

【0059】

この場合、蛋白質脱アミド酵素の基質である蛋白質中のグルタミン残基との親和性が、トランスグルタミナーゼのそれより高いことが必要であるが、後者の反応においては、グルタミン残基の他にリジン残基の ϵ -アミノ基が必要であるのに対し、前者の場合グルタミン残基の他には反応環境中豊富に存在する水を必要とするだけであるので、一般に蛋白質脱アミド酵素の反応の方がトランスグルタミナーゼの反応に先行することが推定できる。もちろん、予め基質蛋白質を蛋白質脱アミド酵素により適当に処理して、所望のグルタミン残基をグルタミン酸残基に変換しておいた後トランスグルタミナーゼ反応に供すれば、所望の架橋度の蛋白質改質物、蛋白質ゲル化物を得ることが出来る。

【0060】

またさらに蛋白質の機能改変用すなわち蛋白質工学用試薬としても使用できる。基質蛋白質が酵素である場合は、その酵素の酵素化学的、物理化学的性質を改

変する事が出来る。例えば酵素蛋白質を本酵素により脱アミドすることにより、酵素蛋白質の等電点が低下しpH安定性を改変することが出来る。また、活性部位の構造や電氣的環境を変化させることにより、その酵素の基質親和性、基質特異性、反応速度、pH依存性、温度依存性、温度安定性などを改変することが出来る。

【0061】

またさらに蛋白質のアミド含量定量用試薬、蛋白質の可溶化用試薬など蛋白質分析・研究用試薬としても使用できる。

【0062】

またさらに穀類、豆類蛋白質の抽出・濃縮効率の向上などに利用できる。一般に小麦、大豆など穀類や豆類の蛋白質は水に不溶性の蛋白質が多く、蛋白質を抽出することは容易ではないが、小麦粉や大豆粉の懸濁液を本酵素で処理し蛋白質を可溶化することにより、蛋白質を容易に抽出することが出来、また高含量の蛋白質単離物を得ることが出来る。

【0063】

大豆蛋白質の場合、一般に、脱脂大豆粉またはフレーク（蛋白質含量約50%）から蛋白質を抽出する際には、まず熱処理やエタノール処理或いはpH4.5付近の等電点処理により蛋白質を不溶化させた後、可溶性の多糖を除いて蛋白質含量約70%の大豆蛋白質濃縮物（コンセントレート）が得られる。さらに高純度の蛋白質が望まれる場合は、大豆粉や濃縮物を希釈アルカリに懸濁・溶解し蛋白質を溶解させ不溶性の物質を除いて調整される。このものは大豆蛋白質単離物（アイソレート）と呼ばれ蛋白質を約90%含む。これらの大豆蛋白質製品は、大豆蛋白質の乳化性、ゲル化特性、保水性等の機能性や高栄養価を利用して、ハム・ソーセージや乳児用食品をはじめ様々な食品に利用されている。

【0064】

これらの大豆蛋白質製品を製造する際に本酵素を利用すれば、蛋白質の溶解性の向上により収率の向上ばかりでなくより高濃度の蛋白質製品を製造することが出来る。さらにこのようにして得られた蛋白質製品は、脱アミド化されているため機能性に優れている。従って、畜肉、魚肉製品、麺類など種々の食品に使用し

た場合優れた効果を示し、また新しいテクスチャーや機能を有する食品の製造が可能となる。

【0065】

以下、本発明の蛋白質脱アミド酵素、蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該ベクターを導入した形質転換体、および、該形質転換体を培地に培養し、蛋白質脱アミド酵素を生産せしめ、培養物より蛋白質脱アミド酵素を採取することを特徴とする蛋白質脱アミド酵素の製造法についてさらに説明する。

【0066】

本発明の蛋白質脱アミド酵素としては、上述した蛋白質脱アミド酵素の製造法で得られるすべての蛋白質脱アミド酵素が含まれるが、特に、配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましく、さらに、配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドがより好ましい。

【0067】

本発明の蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子としては、該蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物から該遺伝子のクローニングによって取得することができる遺伝子や該遺伝子に相同性を有する遺伝子があげられる。相同性としては、少なくとも60%以上の相同性を有する遺伝子、好ましくは80%以上の相同性を有する遺伝子、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する遺伝子をおけることができる。本発明の蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子としては以下の様なヌクレオチド（DNAまたはRNA）が好ましい。

【0068】

下記（a）～（g）から選択されるヌクレオチドからなり、かつ、蛋白質中のアミド基を脱アミドする活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド。

（a）配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド、

（b）配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1個又は複数個のア

ミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド、

(c) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列を有するヌクレオチド、

(d) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされている塩基配列を有するヌクレオチド、

(e) 上記(a)～(d)のいずれかに記載のヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、

(f) 上記(a)～(d)のいずれかに記載のヌクレオチドに相同性を有するヌクレオチド、

(g) 上記(a)～(f)の少なくともいずれか1つに記載のヌクレオチドに縮重するヌクレオチド。

【0069】

本発明の蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子は、上述した蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物から、例えば以下に記載するような方法で該遺伝子のクローニングを行うことによって取得することができる。まず、蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物から上述の方法によって本発明の蛋白質脱アミド酵素を単離、精製し、その部分アミノ酸配列に関する情報を得る。

【0070】

部分アミノ酸配列決定方法としては、例えば、精製した蛋白質脱アミド酵素を直接常法に従ってエドマン分解法〔ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第 256巻、第7990～7997頁(1981)〕によりアミノ酸配列分析〔プロテイン-シーケンサ 476 A、アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製等〕に供してもよいし、あるいはタンパク質加水分解酵素を作用させて限定加水分解を行い、得られたペプチド断片を分離精製し、得られた精製ペプチド断片についてアミノ酸配列分析を行うのが効果的である。

【0071】

こうして得られる部分アミノ酸配列の情報を基に、蛋白質脱アミド酵素遺伝子をクローニングする。一般的に、PCRを用いる方法あるいはハイブリダイゼーシ

ョン法を利用してクローニングを行うことができる。

【0072】

ハイブリダイゼーション法を利用する場合、例えば、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. マニアティス (T. Maniatis) 他著、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、1989年発行] に記載の方法を用いることができる。

【0073】

また、PCR法を利用する場合、以下のような方法を用いることができる。

まず、蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物のゲノムDNA を鋳型とし、部分アミノ酸配列の情報を基にデザインした合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR反応を行い、目的の遺伝子断片を得る。PCR 法は、PCR テクノロジー [PCR Technology、エルリッヒ (Erlich) HA編集、ストックトンプレス社 (Stockton press)、1989年発行] に記載の方法に準じて行う。更に、この増幅 DNA断片について通常用いられる方法、例えば、ジデオキシチェーンターミネーター法で塩基配列を決定すると、決定された配列中に合成オリゴヌクレオチドプライマーの配列以外に蛋白質脱アミド酵素の部分アミノ酸配列に対応する配列が見出され、目的の蛋白質脱アミド酵素遺伝子の一部を取得することができる。もちろん得られた遺伝子断片をプローブとして更にハイブリダイゼーション法等を行うことによって蛋白質脱アミド酵素全長をコードする遺伝子をクローニングすることができる。

【0074】

下記の実施例 26 ではクリセオバクテリウム・グレウム JCM2410を用い、PCR 法を利用して、蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子を決定した。クリセオバクテリウム・グレウム JCM2410由来の蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子の全塩基配列は、配列番号 5 に記載したものであり、これによってコードされるアミノ酸配列は配列番号 6 に記載したものであると決定された。なお、配列番号 6 に記載したアミノ酸配列に対応する塩基配列は配列番号 5 に記載したものの以外に無数に存在するが、これらはすべて本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 7 5 】

配列番号 6 に記載のアミノ酸配列や配列番号 5 に記載の塩基配列の情報を元に、化学合成によって目的とする遺伝子を得ることもできる(参考文献: Gene, 60(1), 115-127 (1987))。

また、本発明の蛋白質脱アミド酵素遺伝子は、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチドや該ヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、該ヌクレオチドに相同性を有するヌクレオチド、及び該ヌクレオチドに縮重するヌクレオチドもそれらがコードするポリペプチドが蛋白質脱アミド酵素活性を有する限り本発明に含まれる。

【 0 0 7 6 】

ここでいう「ストリンジェントな条件下」とは、例えば以下の条件をいう。すなわち 0.5% SDS、5×デンハルツ [Denhartz's、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール 400] 及び 100 μ g/ml サケ精子 DNA を含む 6×SSC (1×SSC は、0.15 M NaCl、0.015 M クエン酸ナトリウム、pH7.0) 中で、50℃～65℃で 4 時間～一晩保温する条件をいう。

【 0 0 7 7 】

クリセオバクテリウム・グレウム JCM2410 を用いて全塩基配列が明らかにされた蛋白質脱アミド酵素遺伝子の全体あるいは一部分をハイブリダイゼーション用のプローブとして用いて、他の蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物のゲノム DNA ライブラリーあるいは cDNA ライブラリーから、配列表 5 の蛋白質脱アミド酵素遺伝子と相同性の高い DNA を選別することができる。

【 0 0 7 8 】

ハイブリダイゼーションは、上記に示したストリンジェントな条件下で行うことができる。例えば、蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物から得たゲノム DNA ライブラリーあるいは cDNA ライブラリーを固定化したナイロン膜を作成し、6×SSC、0.5% SDS、5×デンハルツ、100 μ g/ml サケ精子 DNA を含むプレハイブリダイゼーション溶液中、65℃でナイロン膜をブロッキングする。その後、³²P

でラベルした各プローブを加えて、65℃で一晩保温する。このナイロン膜を6×SSC中、室温で10分間、0.1% SDSを含む2×SSC中、室温で10分間、0.1% SDSを含む0.2×SSC中、45℃で30分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとり、プローブと特異的にハイブリダイズするDNAを検出することができる。また、洗いなどの条件を変えることによって様々な相同性を示す遺伝子を得ることができる。

【0079】

一方、本発明の遺伝子の塩基配列からPCR反応用のプライマーをデザインすることができる。このプライマーを用いてPCR反応を行うことによって、本発明の遺伝子と相同性の高い遺伝子断片を検出したり、更にはその遺伝子全体を得ることもできる。

【0080】

得られた遺伝子が目的の蛋白質脱アミド酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかどうかを確認するには、決定された塩基配列を本発明の蛋白質脱アミド酵素の塩基配列又はアミノ酸配列と比較し、その遺伝子構造及び相同性から推定することもできる。また、得られた遺伝子のポリペプチドを製造し、蛋白質脱アミド酵素活性を測定することにより、目的の蛋白質脱アミド酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかどうか確認することができる。

【0081】

本発明の蛋白質脱アミド酵素遺伝子を用いて、蛋白質脱アミド酵素活性を有するポリペプチドを生産するには以下の方法が便宜である。

まず、目的の蛋白質脱アミド酵素遺伝子を含むベクターを用いて宿主の形質転換を行い、次いで該形質転換体の培養を通常用いられる条件で行うことによって、蛋白質脱アミド酵素活性を有するポリペプチドを生産させることができる。

【0082】

また、宿主としては微生物、動物細胞、植物細胞等を用いることができる。微生物としては、大腸菌、Bacillus属、Streptomyces属、Lactococcus属等の細菌、Saccharomyces属、Pichia属、Kluyveromyces属等の酵母、Aspergillus属、Pen

icillium属、Trichoderma属等の糸状菌が挙げられる。動物細胞としては、バキュロウイルスの系統が挙げられる。

【0083】

発現の確認や発現産物の確認は、蛋白質脱アミド酵素に対する抗体を用いて行うことが簡便であるが、蛋白質脱アミド酵素活性を測定することにより発現の確認を行うこともできる。

【0084】

形質転換体の培養物から蛋白質脱アミド酵素を精製するには上述のように、遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを適宜組み合わせることができる。

【0085】

また、本発明により蛋白質脱アミド酵素の一次構造及び遺伝子構造が明らかとなったことにより、本発明の遺伝子を用いて、ランダム変異あるいは部位特異的変異を導入し、天然の蛋白質脱アミド酵素のアミノ酸配列中に、1個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされている遺伝子を得ることが可能である。これにより、蛋白質脱アミド酵素活性を有するが、至適温度、安定温度、至適pH、安定pH、基質特異性等の性質が少し異なった蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子を得ることが可能であり、遺伝子工学的にこれら蛋白質脱アミド酵素を製造することが可能となる。

【0086】

ランダム変異を導入する方法としては、例えば、DNAを化学的に処理する方法として、亜硫酸水素ナトリウムを作用させシトシン塩基をウラシル塩基に変換するトランジション変異を起こさせる方法〔プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA、第79巻、第1408～1412頁（1982）〕、生化学的方法として、〔 α -S〕 dNTP存在下、二本鎖を合成する過程で塩基置換を生じさせる方法〔ジーン (Gene)、第64巻、第313～319頁（1988）〕、PCRを用いる方法として、反応系にマンガンを加えてPCRを行い、ヌクレオチドの取込みの正確さを低くする方法〔アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第224巻、第347～353頁（1995）〕等

を用いることができる。

【 0 0 8 7 】

部位特異的変異を導入する方法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法〔ギャップド デュプレックス (gapped duplex) 法、ヌクレイック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Research)、第12巻、第24号、第9441～9456頁 (1984)〕、制限酵素の認識部位を利用する方法〔アナリティカル バイオケミストリー、第 200巻、第81～88頁 (1992)、ジーン、第 102巻、第67～70頁 (1991)〕、dut (dUTPase) と ung (ウラシルDNA グリコシラーゼ) 変異を利用する方法〔クンケル (Kunkel) 法、プロシーディングス オブ ザ ナショナル オブ サイエンス オブ ザ USA、第82巻、第488～492 頁 (1985)〕、DNA ポリメラーゼ及び DNAリガーゼを用いたアンバー変異を利用する方法〔オリゴヌクレオチドダイレクティッド デュアル アンバー (Oligonucleotide-directed Dual Amber : ODA) 法、ジーン、第 152巻、第271～275 頁 (1995)、特開平7-289262号公報〕、DNAの修復系を誘導させた宿主を利用する方法 (特開平 8-70874号公報)、DNA鎖交換反応を触媒するタンパク質を利用する方法 (特開平 8-140685号公報)、制限酵素の認識部位を付加した2種類の変異導入用プライマーを用いた PCRによる方法 (USP5,512,463)、不活化薬剤耐性遺伝子を有する二本鎖 DNAベクターと2種類のプライマーを用いた PCRによる方法〔ジーン、第 103巻、第73～77頁 (1991)〕、アンバー変異を利用した PCRによる方法〔国際公開W098/02535号公報〕等を用いることができる。

【 0 0 8 8 】

また、市販されているキットを使用することにより、部位特異的変異を容易に導入することができる。市販のキットとしては、例えば、ギャップド デュプレックス法を用いた Mutan (登録商標) -G (宝酒造社製)、クンケル法を用いた Mutan (登録商標) -K (宝酒造社製)、ODA 法を用いた Mutan (登録商標) -Express Km (宝酒造社製)、変異導入用プライマーとピロコッカス フリオサス (Pyrococcus furiosus) 由来 DNAポリメラーゼを用いたQuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit〔ストラタジーン (STRATAGENE) 社製〕等を用いることができ、また、PCR法を利用するキットとして、TaKaRa LA PCR in vitro Mutagenes

is Kit（宝酒造社製）、Mutan（登録商標）-Super Express Km（宝酒造社製）等を用いることができる。

【0089】

このように、本発明により、蛋白質脱アミド酵素の一次構造及び遺伝子構造が提供されたことにより、蛋白質脱アミド酵素活性を有するポリペプチドの安価で高純度な遺伝子工学的な製造が可能となる。

なお、本明細書では種々の文献等を引用したが、これらはすべて参考として本明細書に組み込まれるものである。

以下、本発明を実施例を用いて詳述するが本発明はこれらに限定されるものではない。以下、特に明記しない限り、本明細書において％はW/V％で示した。

【0090】

【実施例】

実施例 1

クリセオバクテリウム・エスピー No.9670 (*Chryseobacterium* sp. No9670) を前述したLB Base培地で、25℃、64時間振盪培養した。その培養経過を表4に示す。

【0091】

【表 4】

表 4

培養時間 (h)	pH	生育	酵素活性 (U/ml)
18	8.24	++	0.116
40	8.65	+++	0.224
64	9.41	+++	0.201

【0092】

実施例 2

LB 培地に代え、M17 培地 (Difco社製)、Tryptone Soya培地 (Oxioid社製)、ハート・インフュージョン培地 (Dico社製) を用いて同様にして培養したところ、同様に蛋白質脱アミド酵素の生産が確認された

【0093】

実施例 3

実施例 1 で得られた、40 時間培養液を 4℃、12000 rpm (22200 x g)、20 分間の遠心分離により菌体を除去し、得られた遠心上清を、限外濾過膜 (SEP-0013、旭化成製) により約 25 倍に濃縮後、凍結乾燥して粗酵素粉末を得た。これに、2.0 M NaCl を含む 10 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、不溶物を 4℃、10000 rpm (12300 x g)、15 分間の遠心分離により除いた後、得られた遠心上清を、2.0 M NaCl を含む 10 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したフェニルセファロース CL-6B カラム (ファルマシア社製) に供し、2.0 M から 0 M の NaCl 直線濃度勾配により吸着した蛋白質を溶離させた。

【0094】

蛋白質脱アミド活性画分を集め、限外濾過膜で濃縮後、0.6 M NaCl 及び 0.05% Tween 20 を含む 10 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したセファクリル S-100 カラムに供して、同緩衝液で溶離した。蛋白質脱アミド活性画分を集め、限外濾過膜で濃縮し蛋白質脱アミド酵素溶液を得た。精製の結果を表 2 に示す。

【0095】

このようにして得た蛋白質脱アミド酵素の精製標品を 4 ~ 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、図 1 のレーン 2 のように分子量 20 kDa の単一蛋白質であることが確認された。

【0096】

上述の測定法 (Z-Gln-Gly を基質とする方法とカゼインを基質とする方法) で活性を測定したところ 33.7 単位/ml (Z-Gln-Gly を基質)、13.5 単位/ml (カゼインを基質) の酵素標品が得られた。また、トランスグルタミナーゼ活性及びプロテアーゼ活性は検出されなかった。

【0097】

実施例 4 脱アミド化蛋白質の調製

小麦グルテン、乳カゼイン、乳清蛋白質、卵白蛋白質及び大豆蛋白質アイソレート 1 g を 100 ml の 100 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し、6.13 U の蛋白質脱アミド酵素を添加して、37℃ で 24 時間振とう反応させた。この時の脱アミド化率の変化のタイムコースを図 2 に示す。脱アミド化率は、反応終了後に溶液中に遊離したアンモニア又はアンモニウムを定量し、蛋白質の総アミド含量に対

する百分率として表した。蛋白質の総アミド含量は、蛋白質（2% w/v）を3N硫酸中110℃で3時間加水分解し、遊離したアンモニアを定量して求めた。このように、対照として行った酵素無添加の反応ではアンモニアの遊離が観察されなかったのに対し、酵素添加の反応においては、反応時間の進行と共にアンモニアが遊離し脱アミド反応が生じていることが判る。反応後、75℃で15分間加熱し酵素を失活させ反応を停止し、水に対して透析後凍結乾燥して脱アミド化蛋白質粉末を得た。また対照として行った酵素無添加の反応物も同様の処理を施し、対照粉末を得た。

【0098】

又、図3にこれらの脱アミド化蛋白質を対照蛋白質と共に4～12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したパターンを示す。脱アミド化蛋白質（レーン3、6、9、12）は対照の酵素未処理蛋白質と比べて分子量の変化が生じていないこと、すなわち蛋白質の分解も架橋高分子化も生じていないことが判る。ここで脱アミド化したカゼイン（レーン3）や大豆蛋白質（レーン12）において蛋白質のバンドがわずかに高分子側にシフトしていることが観察されるが、これは脱アミド化により蛋白質の負電荷が増加したため同じ負電荷を持つSDSとの結合が静電反発力により減少し、その結果蛋白質-SDS複合体の全体の負電荷が脱アミド化されていない蛋白質に比べ小さくなった結果、電気泳動での移動度が減少したためと考えられる。

【0099】

実施例5 脱アミド化蛋白質の機能性-泡沫特性-の向上

実施例4で得た脱アミド化蛋白質粉末及び対照実験で得た酵素未処理蛋白質粉末を10 mM リン酸緩衝液(pH7.0)に0.5mg/mlの濃度に溶解し、マイクロコンダクティビティ法(Wilde PJ, Colloid and Interface Science, 178, 733-739, 1996)で気泡性、泡沫安定性を測定した。泡沫安定性は5分後の伝導度の残存度で表した。結果を表5に示す。

【0100】

【表 5】

表 5

蛋白質	気泡性 (%)	泡沫安定性 (%)
対照グルテン	測定不能*	8.05
脱アミド化グルテン	1.25	41.44
対照卵白蛋白質	1.50	33.96
脱アミド化卵白蛋白質	1.89	36.79
対照大豆蛋白質アイソート	1.84	42.96
脱アミド化大豆蛋白質アイソート	2.81	63.19

*:気泡性が著しく乏しく測定不能。

【0 1 0 1】

この様に、蛋白質を本酵素で脱アミドすることにより蛋白質の泡沫特性を著しく向上させることができることが判る。特に泡沫特性の乏しい小麦グルテンの場合、本酵素により大きく向上させることができた。

【0 1 0 2】

実施例 6 脱アミド化蛋白質の機能性-乳化特性-の向上

実施例 4 で得た脱アミド化蛋白質粉末及び対照実験で得た酵素未処理蛋白質粉末の溶液 4ml (1.0mg/ml-10mM 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.0)) と 1.0g のコーンオイル (シグマ社製) をバイアルにとり、1 分間ボルテックス・ミキサーにより前攪拌後、シングルパス・バルブ・ホモゲナイザー (EmulsiFlex-20000-B3, Avesten, Ottawa, Canada) に高圧 (200kPa) 下、5 回通すことにより油/水エマルジョンを調製した。フレッシュなエマルジョンの粒子分布を、レーザー・ディフラクション・パーティクル・サイズ分析機 (Coulter LS230, Coulter, Hialeah, FL) を用いて測定した。乳化活性は、比表面積 (1ml のエマルジョン当たりの粒子の表面積) で表した。乳化安定性は、7 日間室温に放置後肉眼でエマルジョンの崩壊を示すクリーミング、フロキュレーション、コアレスセンスの程度を観察した。乳化活性の結果を表 6 に、乳化安定性の結果を表 7 に示す。

【0 1 0 3】

【表 6】

表 6

蛋白質	乳化活性 (cm ² /ml)	蛋白質	乳化活性 (cm ² /ml)
対照グルテン	13,120	対照卵白蛋白質	37,252
脱アミド化グルテン	67,631	脱アミド化卵白蛋白質	68,283
対照カゼイン	41,040	対照大豆蛋白質アイルト	16,512
脱アミド化カゼイン	67,068	脱アミド化大豆蛋白質アイルト	30,796
対照乳清蛋白質	29,534		
脱アミド化乳清蛋白質	29,996		

【0 1 0 4】

【表 7】

表 7	蛋白質	クリーミング	フロキュレーション	コアレッセンス
	対照グルテン	-	-	++++++
	脱アミド化グルテン	-	-	+
	対照カゼイン	++	-	++
	脱アミド化カゼイン	+	-	++
	対照乳清蛋白質	+++	-	-
	脱アミド化乳清蛋白質	+++	-	-
	対照卵白蛋白質	+++	+++	-
	脱アミド化卵白蛋白質	++	++	-
	対照大豆蛋白質アイルト	++	+	+
	脱アミド化大豆蛋白質アイルト	++	+	++

【0105】

この様に、蛋白質を本酵素で脱アミドすることにより蛋白質の乳化活性、乳化安定性を著しく向上させることができることが判る。特に乳化特性の乏しい小麦グルテンの場合、本酵素により大きく向上させることができた。

【0106】

以下に実施例を用いて、本発明を詳細に説明する。尚、本明細書においては、遺伝子操作手法は特に記載しない限り成書（例えば”Molecular Cloning” 2nd ed

., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。

【0107】

実施例 7 クリセオバクテリウム・エスピー No.9670(*Chryseobacterium* sp. No.9670)由来の蛋白質脱アミド酵素をコードする遺伝子の単離

【0108】

a) 染色体DNAの単離

"Current Protocols in Molecular Biology", Unit 2.4 (John Wiley & Sons, Inc., 1994)に従って、100ml のカルチャーから、210 μ g/mlの濃度の染色体DNAを、4.5ml得た。

【0109】

b) 部分アミノ酸配列の決定

実施例 3 で得られた蛋白質脱アミド酵素の精製標品を、プロテイン・シーケンサー (Applied Biosystems社) に供し、配列番号1に示す20残基のN末端アミノ酸配列を決定した。次に、実施例 3 で得られた蛋白質脱アミド酵素の精製標品を過ギ酸により還元・アルキル化した後、トリプシンによる分解を行った。得られた分解物を逆相液体クロマトグラフィーに供し、分離されたペプチド画分の一つをプロテイン・シーケンサーに供し、配列番号 2 に示す20残基の内部アミノ酸配列を決定した。

【0110】

配列番号 1 :

Leu-Ala-Ser-Val-Ile-Pro-Asp-Val-Ala-Thr-Leu-Asn-Ser-Leu-Phe-Asn-Gln-Ile-Lys-Asn

配列番号 2 :

Ser-Pro-Ser-Asn-Ser-Tyr-Leu-Tyr-Asp-Asn-Asn-Leu-Ile-Asn-Thr-Asn-Cys-Val-Leu-Thr

【0111】

c) PCRによるDNAプローブの作成

N末端領域アミノ酸配列および内部アミノ酸配列をもとに、以下の2種の混合オリゴヌクレオチドをDNA合成機 (Applied Biosystems社) により合成し、PCRプライ

マーとした。

配列番号 3

センス・プライマー：

5'-GCI(TA)(CG)IGTIAT(TCA)CC(TACG)GA(TC)GT-3' <N-1g>

配列番号 4

アンチセンス・プライマー：

【0 1 1 2】

5'-A(AG)(AGTC)AC(AG)CA(AG)TT(AGTC)GT(AG)TT(AGT)AT-3' <M-2a>

これらのプライマーとクリセオバクテリウム・エスピー No.9670 (*Chruseobacterium* sp. No9670)の染色体DNAを鋳型として、以下の条件下、Omnigene Thermal Cycler(Hybaidd社)を用いてPCR反応を行なった。

【0 1 1 3】

<PCR反応液>

10 x PCR反応緩衝液 (Perkin Elmer社)	5.0 μ l
dNTP混合液 (それぞれ2.5 mM、Promega社)	4.0 μ l
20 μ M センス・プライマー	10.0 μ l
20 μ M アンチセンス・プライマー	10.0 μ l
蒸留水	20.25 μ l
染色体DNA溶液 (190 μ g/ml)	0.5 μ l
Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer社)	0.25 μ l

【0 1 1 4】

<PCR反応条件>

ステージ1：	変性 (94℃、5分)	1サイクル
ステージ2：	変性 (94℃、1分)	30サイクル
	アニール (44℃、1分)	
	伸長 (72℃、1分)	
ステージ3：	伸長 (72℃、10分)	1サイクル

【0 1 1 5】

得られた約0.48kbのDNA断片をpCRII(Invitrogene社)にクローニング後、塩基

配列を確認したところ、センス・プライマーの直後とアンチセンス・プライマーの直前に、上記の部分アミノ酸配列をコードする塩基配列が見出された。本DNA断片を全長遺伝子クローニングのためのDNAプローブとした。

【0 1 1 6】

d) 遺伝子ライブラリーの作成

クリセオバクテリウム・エスピー No.9670 (*Chryseobacterium* sp. No9670)の染色体DNAのサザン・ハイブリダイゼーション解析の結果、Eco RI分解物中にプローブDNAとハイブリダイズする約4.9 kbのシングルバンドが確認された。この約4.9 kbのEcoRI DNA断片をクローニングするため、以下の様に遺伝子ライブラリーを作成した。上記a)で調製した染色体DNAをEcoRIで分解し、得られた分解物をEcoRI処理した λ ZAPII (Stratagene社)ベクターにライゲーションし、Gigapack II I gold (Stratagene社)を用いてパッケージングし遺伝子ライブラリーを得た。

【0 1 1 7】

e) 遺伝子ライブラリーのスクリーニング

上記c)で得た0.48 kbのDNA断片をMegaprime DNA Labeling system (Amersham社)と P^{32} - α -dCTPを用いてラベルした。これをDNAプローブとして、d)で得た遺伝子ライブラリーをブランク・ハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた陽性ブランクからファージを回収した後、Stratagene社のインストラクションに従い、in vivo Excision法により、約4.5 kb Eco RI断片を含むプラスミドp9T1-2を得た。

【0 1 1 8】

f) 塩基配列の決定

プラスミドp9T1-2の塩基配列を定法に従って決定した。蛋白質脱アミド酵素をコードする塩基配列を配列番号5に示す。また配列番号5によりコードされるアミノ酸配列を、配列番号6に示す。このアミノ酸配列中には、b)で決定したN末端領域アミノ酸配列(配列番号1)および内部アミノ酸配列(配列番号2)が見出された。

【0 1 1 9】

配列番号5

TTGGCGAGTGTAATTCCTGATGTAGCTACATTAAATTCTTTATTCAATCA
AATAAAGAATCAGTCTTGCGGTACCTCTACGGCGTCCTCACCATGCATCA
CATTTCAGATATCCTGTAGACGGATGTTATGCAAGAGCCCATAAGATGAGA
CAAATCTTAATGAACAACGGCTATGACTGTGAAAAACAATTTGTATACGG
AAACCTAAAGGCATCAACAGGAACCTTGCTGTGTGGCGTGGAGCTACCACG
TTGCAATATTGGTAAGCTATAAAAAATGCTTCCGGAGTAACGGAAAAAAGA
ATTATTGATCCTTCACTATTTTCAAGCGGTCCTGTAACAGATACAGCATG
GAGAAACGCTTGCGTTAACACCTCTTGCGGATCTGCATCCGTTTCCTCTT
ATGCTAATACTGCAGGAAATGTTTATTACAGAAGTCCTAGTAATTCTTAC
CTGTATGACAACAATCTGATCAATACCAACTGTGTACTGACTAAATTTTC
ACTGCTTTCCGGATGTTCTCCTTCACCTGCACCGGATGTATCCAGCTGTG
GATTT

(555 bp)

【0 1 2 0】

配列番号 6

L A S V I P D V A T L N S L F N Q I K N
Q S C G T S T A S S P C I T F R Y P V D
G C Y A R A H K M R Q I L M N N G Y D C
E K Q F V Y G N L K A S T G T C C V A W
S Y H V A I L V S Y K N A S G V T E K R
I I D P S L F S S G P V T D T A W R N A
C V N T S C G S A S V S S Y A N T A G N
V Y Y R S P S N S Y L Y D N N L I N T N
C V L T K F S L L S G C S P S P A P D V
S S C G F

(185 amino acid)

【0 1 2 1】

この遺伝子のオープンリーディングフレームを配列番号 7 に示す。配列番号 7
に示すように、全体が 320 アミノ酸残基の Prepro 体としてコードされており、う

ちN-末端の135残基（下記配列番号7の下線部）がPrepro領域、残りの185残基が成熟体に対応する（配列番号6を参照）。

Prepro領域135残基のうち、N-末端の21残基がシグナル配列の特徴を有しているためPre領域と推定され、残りの114残基がPro領域と推定される。

本発明は蛋白質脱アミド化活性を有するポリペプチドやそれをコードするヌクレオチドに特に限定されるものではなく、蛋白質脱アミド化活性を有するポリペプチドからなる更に長いポリペプチド（例えば、Prepro体やPro体等）やそれをコードするヌクレオチドを含むものである。

【0122】

配列番号7

```

AGTTAAATAACCAACCAACTTAACAAAACTCACCATTAACTACAAATTACAATTATT
ATGAAAAATCTTTTTTATCAATGATGGCCTTTGTGACCGTCTTAACTTTTAATTCCTGT
M K N L F L S M M A F V T V L T F N S C
GCCGATTCCAACGGAATCAGGAAATCAACGGAAGGAAAACTAAGTGTAATGATTCT
A D S N G N Q E I N G K E K L S V N D S
AAGCTGAAAGATTTTCGAAAGACTGTACCGGTAGGGATAGACGAAGAAAAACGGAATGATA
K L K D F G K T V P V G I D E E N G M I
AAGGTGTCATTTATGTAACTGCGCAATTCTATGAAATTAAGCCGACCAAAGAAAATGAG
K V S F M L T A Q F Y E I K P T K E N E
CAGTATATCGGAATGCTTAGACAGGCTGTAAAGAATGAATCTCCTGTACACATTTTCTTA
Q Y I G M L R Q A V K N E S P V H I F L
AAGCCTAATAGCAATGAAATAGGAAAAGTGGAGTCTGCAAGTCCGGAAGACGTAAGATAT
K P N S N E I G K V E S A S P E D V R Y
TTTAAACGATCCTGACAAAAGAAGTAAAGGGCAAACCAATAAATTGGCGAGTGTAATT
F K T I L T K E V K G Q T N K L A S V I
CCTGATGTAGCTACATTAAATTCTTTATTCAATCAAATAAAGAATCAGTCTTGCGGTACC
P D V A T L N S L F N Q I K N Q S C G T
TCTACGGCGTCCTCACCATGCATCACATTCAGATATCCTGTAGACGGATGTTATGCAAGA
S T A S S P C I T F R Y P V D G C Y A R
    
```

GCCCATAAGATGAGACAAATCTTAATGAACAACGGCTATGACTGTGAAAAACAATTTGTA
 A H K M R Q I L M N N G Y D C E K Q F V
 TACGGAAACCTAAAGGCATCAACAGGAACCTTGCTGTGTGGCGTGGAGCTACCACGTTGCA
 Y G N L K A S T G T C C V A W S Y H V A
 ATATTGGTAAGCTATAAAAAATGCTTCCGGAGTAACGGAAAAAGAATTATTGATCCTTCA
 I L V S Y K N A S G V T E K R I I D P S
 CTATTTTCAAGCGGTCCTGTAACAGATACAGCATGGAGAAACGCTTGCGTTAACACCTCT
 L F S S G P V T D T A W R N A C V N T S
 TGCGGATCTGCATCCGTTTCCTCTTATGCTAATACTGCAGGAAATGTTTATTACAGAAGT
 C G S A S V S S Y A N T A G N V Y Y R S
 CCTAGTAATTCTTACCTGTATGACAACAATCTGATCAATACCAACTGTGTACTGACTAAA
 P S N S Y L Y D N N L I N T N C V L T K
 TTTTCACTGCTTTCGGATGTTCTCCTTCACCTGCACCGGATGTATCCAGCTGTGGATT
 F S L L S G C S P S P A P D V S S C G F 320
 TAATTAATTGATAATTTTACAGCACCTGCTCATTACAGAATCAGCAGGTGCTGTTATAT (1080)

*

【0 1 2 3】

配列番号8

M K N L F L S M M A F V T V L T F N S C
 A D S N G N Q E I N G K E K L S V N D S
 K L K D F G K T V P V G I D E E N G M I
 K V S F M L T A Q F Y E I K P T K E N E
 Q Y I G M L R Q A V K N E S P V H I F L
 K P N S N E I G K V E S A S P E D V R Y
 F K T I L T K E V K G Q T N K L A S V I
 P D V A T L N S L F N Q I K N Q S C G T
 S T A S S P C I T F R Y P V D G C Y A R
 A H K M R Q I L M N N G Y D C E K Q F V
 Y G N L K A S T G T C C V A W S Y H V A

I L V S Y K N A S G V T E K R I I D P S
L F S S G P V T D T A W R N A C V N T S
C G S A S V S S Y A N T A G N V Y Y R S
P S N S Y L Y D N N L I N T N C V L T K
F S L L S G C S P S P A P D V S S C G F

(320 amino acid)

【0 1 2 4】

実施例 8 蛋白質脱アミド酵素の大腸菌での生産

蛋白質脱アミド酵素の大腸菌での発現プラスミドの構築

N末端領域アミノ酸配列およびC末端領域アミノ酸配列をコードするDNA配列をもとに、以下の2種のオリゴヌクレオチドをDNA合成機 (Applied Biosystems社) により合成し、PCRプライマーとした。

【0 1 2 5】

配列番号 9

成熟体発現用センス・プライマー：

5'-CCGAATTCTTGGCGAGTGTAATTCCTGATG-3'

配列番号 1 0

ブレプロ体発現用センス・プライマー

5'-CAGAATTCATGAAAAATCTTTTTTATCAATGGCC-3'

配列番号 1 1

アンチセンス・プライマー：

5'-TCGAATTCTTAAAAATCCACAGCTGGATAC-3'

【0 1 2 6】

これらのプライマーと蛋白質脱アミド酵素遺伝子を有するプラスミドp9T1-2を鋳型として、以下の条件下、Omnigene Thermal Cycler (Hybaid 社)を用いてPCR反応を行なった。

【0 1 2 7】

<PCR反応液>

10 x PCR反応緩衝液 (Perkin Elmer社)

10.0 μ l

dNTP混合液 (それぞれ2.5 mM、Promega社)	8.0 μ l
20 μ M センス・プライマー	2.5 μ l
20 μ M アンチセンス・プライマー	2.5 μ l
蒸留水	75.5 μ l
プラスミドp7T-1溶液 (50 μ g/ml)	1.0 μ l
Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer社)	0.5 μ l

<PCR反応条件>

ステージ1: 変性 (94℃、5分)	1サイクル
ステージ2: 変性 (94℃、1分)	30サイクル
アニール (55℃、1分)	
伸長 (72℃、1分)	
ステージ3: 伸長 (72℃、10分)	1サイクル

【0 1 2 8】

成熟体発現用センスプライマーとアンチセンスプライマーの組み合わせで得られた約0.57kbのDNA断片及びブレプロ体発現用センスプライマーとアンチセンスプライマーの組み合わせで得られた約0.98kbのDNA断片をそれぞれpCRII(Invitrogen社)にクローニングし、塩基配列が正しいことを確認した後、これらのプラスミドから EcoRI処理により約0.57 kb及び約0.98kbのDNA断片を回収した。これらのDNA断片を大腸菌での発現ベクターpGEX-1 λ T (Pharmacia社)のEcoRI部位に挿入し、pGEX-1 λ Tが有するグルタチオンSトランスフェラーゼのコードDNAのC末端に蛋白質脱アミド酵素のコードDNAを同方向に連結し、成熟体をコードするDNAを含むプラスミドpN7-9及びブレプロ体をコードするDNAを含むプラスミドpP3-9をそれぞれ得た。これらのプラスミドは、tacプロモーターの制御下でグルタチオンSトランスフェラーゼと蛋白質脱アミド酵素の融合蛋白質を発現させることが出来、Thrombin処理により融合蛋白質から蛋白質脱アミド酵素を切り出すことが出来る。

【0 1 2 9】

蛋白質脱アミド酵素の大腸菌での発現

発現プラスミドpN7-9及びpP3-9を大腸菌BL21(Pharmacia社)に導入し形質転換

体を得た。また対照として発現ベクターpGEX-1 λ Tを有する大腸菌BL21の形質転換体も得た。これらの形質転換体を100 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB培地で37℃, 200rpmで培養して得た対数増殖期(OD600=0.9~1.0)の細胞に終濃度0.1 mMのIPTGを添加後さらに4時間同条件で培養し集菌した。菌体を培養液の1/10量の50 mM TrisHCl, pH8.0/2 mM EDTAに懸濁し、終濃度0.1 mg/mlのEgg white lysozymeと終濃度0.1%のTriton X-100を添加し、30℃で15 min放置後、温和な超音波処理(10 sec. On and 30 sec. Offを3 cycles)で粘濁なDNAを揃断しCell extractを得た。このCell extract 100 μ lに、4 μ lのThrombin(1U/ μ l-9 mM sodium phosphate, pH6.5/140 mM NaCl)を添加し、室温に16時間放置し、Thrombin処理Cell extractを得た。また4 μ lの緩衝液(9 mM sodium phosphate, pH6.5/140 mM NaCl)を添加し、同様の反応を行ったものをThrombin処理の対照とした。

【0 1 3 0】

得られたサンプルについて、蛋白質脱アミド酵素活性の測定を行った結果を以下の表 8 に示す。

【0 1 3 1】

【表 8】

サンプル	形質転換体	Trombin処理	蛋白質脱アミド活性 (mU/ml)	
			基質: Z-Gln-Gly	基質: カゼイン
1	E. coli BL21/pN7-9	・	31.10	16.99
2	E. coli BL21/pN7-9	+	37.32	20.67
3	E. coli BL21/pP3-9	・	1.05	2.75
4	E. coli BL21/pP3-9	+	1.54	3.40
5	E. coli BL21/pGEX-1 λ T	・	0.00	0.00
6	E. coli BL21/pGEX-1 λ T	+	0.00	0.00

【0 1 3 2】

この様に、成熟体の蛋白質脱アミド酵素発現プラスミドpN7-9を有する大腸菌は、蛋白質脱アミド活性を発現していることが判る。また、プレプロ体の蛋白質脱アミド酵素発現プラスミドpP3-9を有する大腸菌も低レベルながら蛋白質脱アミド酵素活性を発現した。一方、対照とした発現ベクターpGEX-1 λ Tを有する大腸菌には蛋白質脱アミド活性の発現は観察されなかった。

【0 1 3 3】

また、サンプル 1、2、5 及び 6 を 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、蛋白質脱アミド酵素に対する抗体を用いた Western 解析を行った。その結果、サンプル 1 中にはグルタチオン S 転スフェラーゼと成熟体蛋白質脱アミド酵素との融合蛋白質に相当する分子量約 43Da の位置に抗体と反応するバンドが検出され、サンプル 2 中には、この分子量約 43Da のバンドの他に成熟体蛋白質脱アミド酵素の分子量約 20kDa の位置にバンドが検出された。一方、サンプル 5、6 中には抗体と反応するバンドは何も検出されなかった。

【0 1 3 4】

これらの結果より、本発明で得られた蛋白質脱アミド酵素遺伝子を用いて、組換え蛋白質脱アミド酵素を大腸菌を用いて製造出来ることが確認された。

【0 1 3 5】

【発明の効果】

蛋白質中のグルタミンに作用して脱アミド反応を触媒する新規な酵素として、微生物より初めて見い出され、本酵素は広い応用範囲が期待される。

また、本発明により、蛋白質脱アミドの一次構造及び遺伝子構造が提供されたことにより、蛋白質脱アミド酵素活性を有するポリペプチドの安価で高純度な遺伝子工学的な製造が可能となる。

【0 1 3 6】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Amano Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> NOVEL PROTEIN-DEAMIDATING ENZYME, MICROORGANISM

PRODUCING THE SAME, GENE ENCODING THE SAME, PRODUCTION

PROCESS THEREFOR, AND USE THEREOF

<130> P-33804

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Cryseobacterium sp. No. 9670

<400> 1

Leu Ala Ser Val Ile Pro Asp Val Ala Thr Leu Asn Ser Leu Phe Asn

1

5

10

15

Gln Ile Lys Asn

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Chryseobacterium sp. No. 9670

<400> 2

Ser Pro Ser Asn Ser Tyr Leu Tyr Asp Asn Asn Leu Ile Asn Thr Asn

1

5

10

15

Cys Val Leu Thr

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified#base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified#base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified#base

<222> (9)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

gcnwsngtna thccngaygt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

arnacrcart tngtrttat

20

<210> 5

<211> 555

<212> DNA

<213> Chryseobacterium sp. No. 9670

<400> 5

ttggcgagtg taattcctga tgtagctaca ttaaattctt tattcaatca aataaagaat 60

cagtcttgcg gtacctctac ggcgtcctca ccatgcatca cattcagata tcctgtagac 120

ggatgttatg caagagccca taagatgaga caaatcttaa tgaacaacgg ctatgactgt 180

gaaaaacaat ttgtatacgg aaacctaaag gcatcaacag gaacttgctg tgtggcgtgg 240

agctaccacg ttgcaatatt ggtaagctat aaaaatgctt ccggagtaac ggaaaaaaga 300

attattgatc cttcactatt ttcaagcggc cctgtaacag atacagcatg gagaaacgct 360

tgcgttaaca cctcttgagg atctgcatcc gtttcctctt atgctaatac tgcaggaaat 420

gtttattaca gaagtcctag taattcttac ctgtatgaca acaatctgat caataccaac 480

tgtgtactga ctaaattttc actgctttcc ggatgttctc cttcacctgc accggatgta 540

tccagctgtg gattt 555

<210> 6

<211> 185

<212> PRT

<213> Chryseobacterium sp. No. 9670

<400> 6

Leu Ala Ser Val Ile Pro Asp Val Ala Thr Leu Asn Ser Leu Phe Asn

1 5 10 15

Gln Ile Lys Asn Gln Ser Cys Gly Thr Ser Thr Ala Ser Ser Pro Cys

20 25 30

Ile Thr Phe Arg Tyr Pro Val Asp Gly Cys Tyr Ala Arg Ala His Lys

35 40 45

Met Arg Gln Ile Leu Met Asn Asn Gly Tyr Asp Cys Glu Lys Gln Phe

50 55 60

Val Tyr Gly Asn Leu Lys Ala Ser Thr Gly Thr Cys Cys Val Ala Trp
65 70 75 80

Ser Tyr His Val Ala Ile Leu Val Ser Tyr Lys Asn Ala Ser Gly Val
85 90 95

Thr Glu Lys Arg Ile Ile Asp Pro Ser Leu Phe Ser Ser Gly Pro Val
100 105 110

Thr Asp Thr Ala Trp Arg Asn Ala Cys Val Asn Thr Ser Cys Gly Ser
115 120 125

Ala Ser Val Ser Ser Tyr Ala Asn Thr Ala Gly Asn Val Tyr Tyr Arg
130 135 140

Ser Pro Ser Asn Ser Tyr Leu Tyr Asp Asn Asn Leu Ile Asn Thr Asn
145 150 155 160

Cys Val Leu Thr Lys Phe Ser Leu Leu Ser Gly Cys Ser Pro Ser Pro
165 170 175

Ala Pro Asp Val Ser Ser Cys Gly Phe
180 185

<210> 7

<211> 1080

<212> DNA

<213> Chryseobacterium sp. No. 9670

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(1020)

<220>

<221> mat#peptide

<222> (466)..(1020)

<400> 7

agttaaaata accaaccaac ttaacaaaaa ctcaccatta aactacaaat tacaattatt 60

atg aaa aat ctt ttt tta tca atg atg gcc ttt gtg acc gtc tta act 108

Met Lys Asn Leu Phe Leu Ser Met Met Ala Phe Val Thr Val Leu Thr

-135 -130 -125 -120

ttt aat tcc tgt gcc gat tcc aac ggg aat cag gaa atc aac gga aag 156

Phe Asn Ser Cys Ala Asp Ser Asn Gly Asn Gln Glu Ile Asn Gly Lys

-115 -110 -105

gaa aaa cta agt gta aat gat tct aag ctg aaa gat ttc gga aag act 204

Glu Lys Leu Ser Val Asn Asp Ser Lys Leu Lys Asp Phe Gly Lys Thr

-100 -95 -90

gta ccg gta ggg ata gac gaa gaa aac gga atg ata aag gtg tca ttt 252

Val Pro Val Gly Ile Asp Glu Glu Asn Gly Met Ile Lys Val Ser Phe

-85 -80 -75

atg tta act gcg caa ttc tat gaa att aag ccg acc aaa gaa aat gag 300
Met Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Glu Ile Lys Pro Thr Lys Glu Asn Glu

-70

-65

-60

cag tat atc gga atg ctt aga cag gct gtt aag aat gaa tct cct gta 348
Gln Tyr Ile Gly Met Leu Arg Gln Ala Val Lys Asn Glu Ser Pro Val

-55

-50

-45

-40

cac att ttc tta aag cct aat agc aat gaa ata gga aaa gtg gag tct 396
His Ile Phe Leu Lys Pro Asn Ser Asn Glu Ile Gly Lys Val Glu Ser

-35

-30

-25

gca agt ccg gaa gac gta aga tat ttt aaa acg atc ctg aca aaa gaa 444
Ala Ser Pro Glu Asp Val Arg Tyr Phe Lys Thr Ile Leu Thr Lys Glu

-20

-15

-10

gta aaa ggg caa acc aat aaa ttg gcg agt gta att cct gat gta gct 492
Val Lys Gly Gln Thr Asn Lys Leu Ala Ser Val Ile Pro Asp Val Ala

-5

-1 1

5

aca tta aat tct tta ttc aat caa ata aag aat cag tct tgc ggt acc 540
Thr Leu Asn Ser Leu Phe Asn Gln Ile Lys Asn Gln Ser Cys Gly Thr

10

15

20

25

tct acg gcg tcc tca cca tgc atc aca ttc aga tat cct gta gac gga 588
Ser Thr Ala Ser Ser Pro Cys Ile Thr Phe Arg Tyr Pro Val Asp Gly

30

35

40

tgt tat gca aga gcc cat aag atg aga caa atc tta atg aac aac ggc 636

Cys Tyr Ala Arg Ala His Lys Met Arg Gln Ile Leu Met Asn Asn Gly

45

50

55

tat gac tgt gaa aaa caa ttt gta tac gga aac cta aag gca tca aca 684

Tyr Asp Cys Glu Lys Gln Phe Val Tyr Gly Asn Leu Lys Ala Ser Thr

60

65

70

gga act tgc tgt gtg gcg tgg agc tac cac gtt gca ata ttg gta agc 732

Gly Thr Cys Cys Val Ala Trp Ser Tyr His Val Ala Ile Leu Val Ser

75

80

85

tat aaa aat gct tcc gga gta acg gaa aaa aga att att gat cct tca 780

Tyr Lys Asn Ala Ser Gly Val Thr Glu Lys Arg Ile Ile Asp Pro Ser

90

95

100

105

cta ttt tca agc ggt cct gta aca gat aca gca tgg aga aac gct tgc 828

Leu Phe Ser Ser Gly Pro Val Thr Asp Thr Ala Trp Arg Asn Ala Cys

110

115

120

gtt aac acc tct tgc gga tct gca tcc gtt tcc tct tat gct aat act 876

Val Asn Thr Ser Cys Gly Ser Ala Ser Val Ser Ser Tyr Ala Asn Thr

125

130

135

gca gga aat gtt tat tac aga agt cct agt aat tct tac ctg tat gac 924

Ala Gly Asn Val Tyr Tyr Arg Ser Pro Ser Asn Ser Tyr Leu Tyr Asp

140

145

150

aac aat ctg atc aat acc aac tgt gta ctg act aaa ttt tca ctg ctt 972

Asn Asn Leu Ile Asn Thr Asn Cys Val Leu Thr Lys Phe Ser Leu Leu

155

160

165

tcc gga tgt tct cct tca cct gca ccg gat gta tcc agc tgt gga ttt 1020

Ser Gly Cys Ser Pro Ser Pro Ala Pro Asp Val Ser Ser Cys Gly Phe

170

175

180

185

taattaattg ataattttac agcacctgct catttacaga atcagcaggt gctgttatat 1080

<210> 8

<211> 320

<212> PRT

<213> Chryseobacterium sp. No. 9670

<400> 8

Met Lys Asn Leu Phe Leu Ser Met Met Ala Phe Val Thr Val Leu Thr

-135

-130

-125

-120

Phe Asn Ser Cys Ala Asp Ser Asn Gly Asn Gln Glu Ile Asn Gly Lys

-115

-110

-105

Glu Lys Leu Ser Val Asn Asp Ser Lys Leu Lys Asp Phe Gly Lys Thr

-100

-95

-90

Val Pro Val Gly Ile Asp Glu Glu Asn Gly Met Ile Lys Val Ser Phe

-85

-80

-75

Met Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Glu Ile Lys Pro Thr Lys Glu Asn Glu

-70

-65

-60

Gln Tyr Ile Gly Met Leu Arg Gln Ala Val Lys Asn Glu Ser Pro Val
-55 -50 -45 -40

His Ile Phe Leu Lys Pro Asn Ser Asn Glu Ile Gly Lys Val Glu Ser
-35 -30 -25

Ala Ser Pro Glu Asp Val Arg Tyr Phe Lys Thr Ile Leu Thr Lys Glu
-20 -15 -10

Val Lys Gly Gln Thr Asn Lys Leu Ala Ser Val Ile Pro Asp Val Ala
-5 -1 1 5

Thr Leu Asn Ser Leu Phe Asn Gln Ile Lys Asn Gln Ser Cys Gly Thr
10 15 20 25

Ser Thr Ala Ser Ser Pro Cys Ile Thr Phe Arg Tyr Pro Val Asp Gly
30 35 40

Cys Tyr Ala Arg Ala His Lys Met Arg Gln Ile Leu Met Asn Asn Gly
45 50 55

Tyr Asp Cys Glu Lys Gln Phe Val Tyr Gly Asn Leu Lys Ala Ser Thr
60 65 70

Gly Thr Cys Cys Val Ala Trp Ser Tyr His Val Ala Ile Leu Val Ser
75 80 85

Tyr Lys Asn Ala Ser Gly Val Thr Glu Lys Arg Ile Ile Asp Pro Ser

90	95	100	105
Leu Phe Ser Ser Gly Pro Val Thr Asp Thr Ala Trp Arg Asn Ala Cys			
	110	115	120
Val Asn Thr Ser Cys Gly Ser Ala Ser Val Ser Ser Tyr Ala Asn Thr			
	125	130	135
Ala Gly Asn Val Tyr Tyr Arg Ser Pro Ser Asn Ser Tyr Leu Tyr Asp			
	140	145	150
Asn Asn Leu Ile Asn Thr Asn Cys Val Leu Thr Lys Phe Ser Leu Leu			
	155	160	165
Ser Gly Cys Ser Pro Ser Pro Ala Pro Asp Val Ser Ser Cys Gly Phe			
170	175	180	185

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

ccgaattcctt ggcgagtgtgta attcctgatg

30

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10

cagaattcat gaaaaatctt tttttatcaa tggcc

35

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

tcgaattctt aaaatccaca gctggatac

29

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 3 精製蛋白質脱アミド酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。レーン 1 は分子量マーカー蛋白質、レーン 2 が精製蛋白質脱アミド酵素である。

【図 2】

実施例 4 の蛋白質の脱アミド化率の変化のタイムコースを示す図である。

【符号の説明】

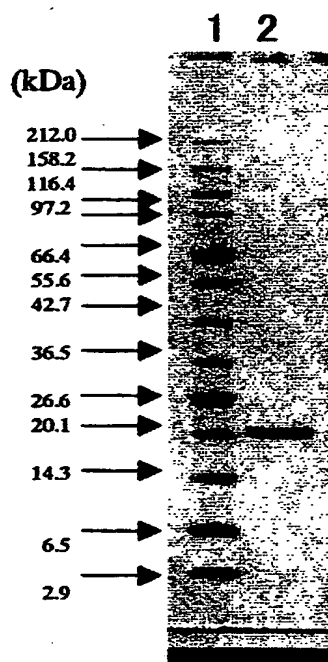
○は小麦グルテン、●はカゼイン、▲は乳清蛋白質、□は卵白蛋白質、△は大豆蛋白質アイソレートを表す。

【図 3】

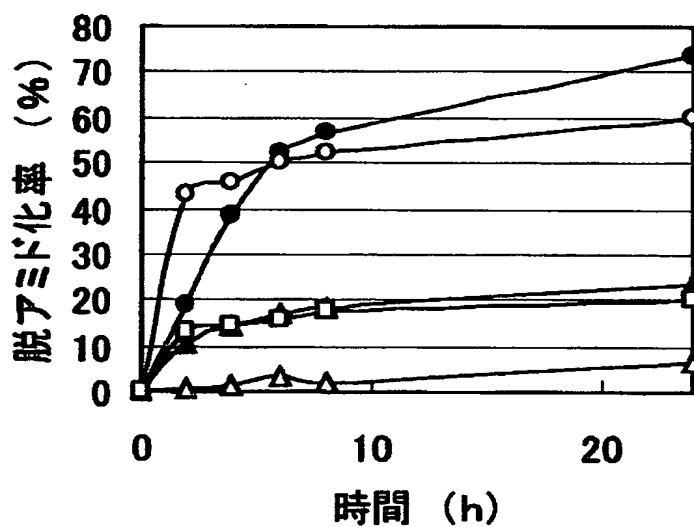
実施例 4 の脱アミド化蛋白質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。レーン 1、4、7、10 は分子量マーカー蛋白質、レーン 2、5、8、11 は順に対照のカゼイン、乳清蛋白質、卵白蛋白質、大豆蛋白質アイソレート、レーン 3、6、9、12 は順に脱アミド化されたカゼイン、乳清蛋白質、卵白蛋白質、大豆蛋白質アイソレートである。

【書類名】 図面

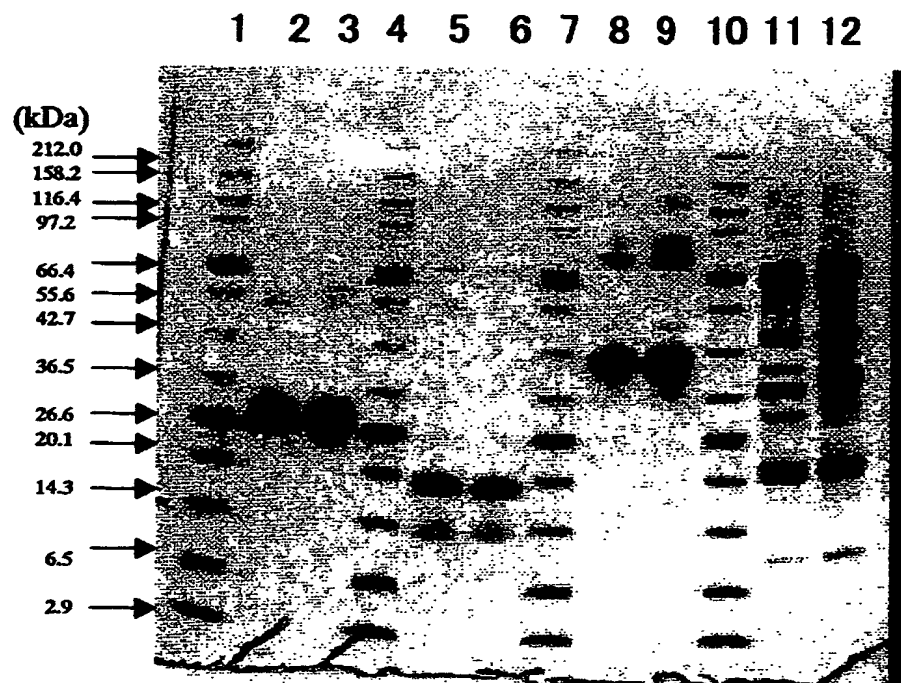
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】蛋白質中の側鎖アミド基に作用して、側鎖カルボキシル基とアンモニアを遊離する作用を有する新規蛋白質脱アミド酵素、それを生産する微生物、それをコードする遺伝子、その製造法及び用途を提供する。

【解決手段】シトファガレス (Cytophagales) 或いはアクチノマイセテス (Actinomycetes) に分類される細菌に属し、蛋白質中のアミド基を脱アミドする性質を有する酵素生産能を有する菌株、あるいはクリセオバクテリウム (Chryseobacterium) 属に属する新菌クリセオバクテリウム・エスピーNo. 9670を培地に培養し、該酵素を生産せしめ、培養物より該酵素を採取する酵素の製造法、蛋白質中のアミド基に直接作用する新規な酵素を用いた蛋白質の修飾方法、並びに該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターを導入した形質転換体、および、該形質転換体を培地に培養し、蛋白質脱アミド酵素を生産せしめ、培養物より蛋白質脱アミド酵素を採取する方法。

【選択図】なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000216162]

- | | |
|----------|-------------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月10日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 |
| 氏 名 | 天野製薬株式会社 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2000年10月 6日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 |
| 氏 名 | 天野エンザイム株式会社 |